



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0115907
(43) 공개일자 2017년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/65 (2006.01) G01N 33/483 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 21/658 (2013.01)
G01N 33/483 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0043731
(22) 출원일자 2016년04월08일
심사청구일자 2016년04월08일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
최연호
서울특별시 성북구 길음로9길 50 길음뉴타운9단지
아파트 912동 802호
박재나
경기도 성남시 분당구 백현로 234, 301동 1302호
(정자동, 한솔마을한일아파트)
(74) 대리인
특허법인 다해

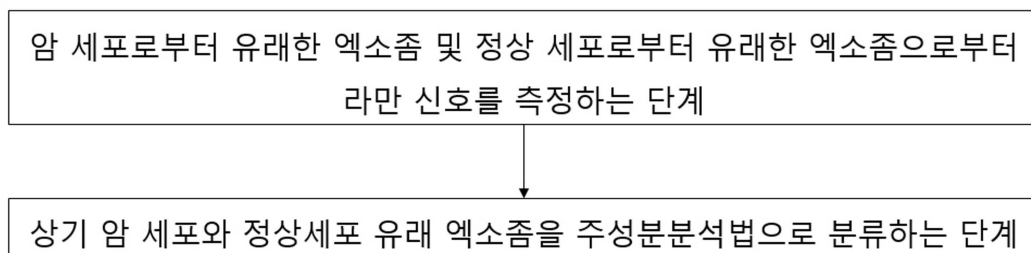
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류 방법 및 세포 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류법 및 세포 진단 방법에 관한 것이며, 보다 상세하게는 암 세포와 정상 세포로부터 유래한 엑소좀을 라만 분광법을 통해 라만 신호를 획득하고, 상기 획득된 라만 신호를 정규화시켜 주성분분석법(PCA)을 수행하여 암 세포와 정상 세포를 보다 정확하게 구분하여 암의 조기 진단을 수행할 수 있으며, 나아가 환자 친화적인 진단 방법을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C2537010015

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 나노기술기반 고유 엑소좀을 통한 암의 진단기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C3477

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구중심병원 육성 R&D

연구과제명 미래의료수요 대응 의료기기 개발 및 글로벌화를 위한 개방형 연구 비즈니스 플랫폼 구축

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 안암병원

연구기간 2014.12.11 ~ 2023.01.10

명세서

청구범위

청구항 1

암 세포로부터 유래한 엑소좀 및 정상 세포로부터 유래한 엑소좀으로부터 라만 신호를 측정하는 단계; 및
상기 암 세포와 정상세포 유래 엑소좀을 주성분분석법으로 분류하는 단계를 포함하는 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 주성분분석법으로 분류하는 단계는 상기 라만 신호의 파장을 복수 개로 등분하여 각 등분된 파장대에서의 신호값을 변수로 하여 진행되는 것을 특징으로 하는 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류방법.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 주성분분석법으로 분류하는 단계에서 암 세포 영역과 정상 세포 영역으로 구분되는 것을 특징으로 하는 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 암 세포는 폐암 세포인 것을 특징으로 하는 엑소좀의 라만 신호 분류방법.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따라 엑소좀의 라만 신호를 분류하는 단계; 및

임의 세포로부터의 라만 신호를 측정하는 단계; 및

상기 측정된 라만 신호를 상기 분류된 엑소좀의 라만 신호와 비교하는 단계; 및

상기 비교하는 단계의 결과에 따라 상기 임의 세포의 종류가 결정되는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 암 세포 진단 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 임의 세포의 라만 신호는 제 2항과 동일하게 등분되어 신호값을 얻는 것을 특징으로 하는 암세포 진단 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명의 목적은 암 세포와 정상 세포로부터 유래한 엑소좀을 라만분광법 및 주성분분석법을 이용하여, 보다 정확하게 구분하기 위한 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류 방법 및 세포 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 엑소좀(exosome)은 세포에서 분비되고, 50~200nm 크기를 가지며, 모세포의 특성을 포함하는 입자이다. 엑소좀은 세포가 내포 작용으로 인하여 세포 내부에 다포성소체를 만든 뒤, 이들이 외포 작용에 의해 나감으로써 생성된다. 따라서 엑소좀은 생체막으로 구성되며, 그 내부에 mRNA, RNA 및 단백질 등을 포함하고 있다. 상기 물질들을

수송하며 엑소솜은 세포간 신호전달(intercellular communication)을 수행한다. 특히 암세포에서 유래된 엑소솜은 암의 전이에 관여하여 다른 정상세포가 암세포로 변이하도록 영향을 미친다.

[0003] 라만분광법은 조사되는 빛의 비탄성 산란(inelastic scattering)을 이용하여 분자의 진동상태를 구분해낸다. 분자의 진동상태는 물질의 고유적인 특성이므로 라만분광에 의해 생기는 분광그래프 또한 물질 고유의 그래프이다. 표면 증강 라만 분광법(SERS, Surface enhanced Raman spectroscopy)은 기존의 신호 세기가 약한 라만분광법의 단점을 극복한 기술이다. 이를 이용하면 신호의 세기가 증폭되어 구분이 되지 않던 라만신호가 구분된다. 그 중 금 나노 파티클을 염으로 이용하여 서로 응집시킨 구조는 제작 방법도 매우 간단하며 신호를 증폭시킬 수 있기에 효율적인 표면 증강 라만 분광법의 기관이다. 그러나, 단일 분자가 아닌 생체입자의 라만신호는 복잡한 양상을 띠고 있어 후처리 과정 없이는 해석이 매우 힘들다.

[0004] 주성분분석법(PCA, Principal component analysis)은 많은 변수들을 원하는 몇 개의 변수만으로 축소시키는 기법이다. 이를 이용하여 기존의 다차원 스펙트럼을 몇 개의 변수로 디콘볼루션(deconvolution)하여 2차원으로 만들 수 있고, 차원을 축소시키거나, 주성분이 어느 것인지를 확인하고자 할 때 사용이 가능하다.

[0005] 암은 세계적으로 매년 인구 10만 명당 대략 270명 정도 발병하고, 대략 30%가 이로 인해 사망한다. 폐암의 경우 5년 생존율이 22%로 매우 낮은 편이고, 원격 전이가 되었을 경우 그 생존율은 5%로 급격히 떨어진다. 이처럼 암은 조기진단 및 치료가 매우 중요한 질병이다.

[0006] 암의 조기 진단 방법에는 여러 가지 방법이 존재하나, 보다 향상된 정확도를 가지며, 환자 친화적인 암의 진단 방법이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 것으로, 정확한 암의 조기 진단 및 환자 친화적인 진단 방법을 제공하기 위하여 패턴인식을 통한 엑소솜의 라만 신호 분류법 및 세포 진단 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일실시예에 따른 패턴인식을 통한 엑소솜의 라만 신호 분류법은, 암 세포로부터 유래한 엑소솜 및 정상 세포로부터 유래한 엑소솜으로부터 라만 신호를 측정하는 단계; 및 상기 암 세포와 정상세포 유래 엑소솜을 주성분분석법으로 분류하는 단계를 포함한다.

[0009] 또한, 본 발명에 따른 상기 주성분분석법으로 분류하는 단계는 상기 라만 신호의 파장을 복수 개로 등분하여 각 등분된 파장대에서의 신호값을 변수로 하여 진행되는 것을 특징으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명에 따른 상기 주성분분석법으로 분류하는 단계에서 암 세포 영역과 정상 세포 영역으로 구분되는 것을 특징으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명에 따른 상기 암 세포는 폐암 세포인 것을 특징으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명에 따른 세포 진단 방법은 엑소솜의 라만 신호를 분류하는 단계; 및 임의 세포로부터의 라만 신호를 측정하는 단계; 및 상기 측정된 라만 신호를 상기 분류된 엑소솜의 라만 신호와 비교하는 단계; 및 상기 비교하는 단계의 결과에 따라 상기 임의 세포의 종류가 결정되는 단계를 포함한다.

[0013] 그리고, 본 발명에 따른 상기 임의 세포의 라만 신호는 파장을 복수 개로 등분하여 신호값을 얻는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 폐암 세포로부터 유래한 H1299 등의 엑소솜의 라만 신호를 분석하고, 이를 정상세포인 폐포(alveolar cell)로부터 유래한 엑소솜의 라만 신호와 비교 및 분석할 수 있으며, 상기 분석 결과에 따라, 암 세포와 정상 세포를 용이하게 구분할 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 X선 검사, 생체 검사 등의 기존 암 진단 방법과 비교하여 보다 환자 친화적인 진단 방법을 통해 암 세포와 정상 세포를 구분하는 방법을 제시할 수 있다.

[0016] 그리고, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 컴퓨터 프로그램을 이용하여 보다 용이하게 엑소좀의 라만 신호를 해석 및 분류할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 엑소좀의 라만 신호 분류방법의 단계도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 폐암세포인 H522와 H1299, 그리고 정상세포(Alveolar)에서 측정된 라만신호 결과이다.

도 3은 상기 등분된 라만시프트 파장대의 신호값을 기준으로 폐암세포와 암세포를 주성분분석법으로 분류한 결과이다.

도 4는 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따른 세포 진단 방법의 단계도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 라만 신호 분석방법의 모식도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 주성분분석법(PCA)으로 분석한 score plot이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 주성분 분석법(PCA)으로 분석한 loading plot이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하 본 발명의 바람직한 실시를 보다 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명은 다수의 상이한 형태로 구현될 수 있고, 기술된 실시 예에 제한되지 않음을 이해하여야 한다. 하기에 설명되는 본 발명의 실시 예는 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위한 것임에 유의하여야 한다.

[0019] 본 발명은 상술한 문제를 해결하기 위하여, 암 세포로부터 유래한 엑소좀 및 정상 세포로부터 유래한 엑소좀으로부터 라만 신호의 신호값을 등분한 후, 각 신호값을 변수로 하여 이를 주성분분석법을 분류하여 암고 정상세포 영역을 분류하는 방법을 제공한다.

[0020] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 엑소좀의 라만 신호 분류방법의 단계도이다.

[0021] 도 1을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 엑소좀의 라만 신호 분류방법은, 암 세포로부터 유래한 엑소좀 및 정상 세포로부터 유래한 엑소좀으로부터 라만 신호를 측정하는 단계; 및 상기 암 세포와 정상세포 유래 엑소좀을 주성분분석법으로 분류하는 단계를 포함하는 패턴인식을 통한 엑소좀의 라만 신호 분류방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에서는 암세포 유래 엑소좀과 정상세포 유래 엑소좀에 785nm 파장대의 레이저를 조사하여 라만신호를 측정하였는데, 상기 측정된 라만신호의 라만시프트 신호를 474cm^{-1} 부터 1800cm^{-1} 까지 1030 등분하여 이를 주성분분석법의 변수로 활용한다.

[0023] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 폐암세포인 H522와 H1299, 그리고 정상세포(Alveolar)에서 측정된 라만신호 결과이다.

[0024] 도 2를 참조하면, 정상세포와 달리 폐암세포는 일부 라만시프트 파장대에서 특징적인 피크값을 보이는 것을 알 수 있다(적색 부분 참조).

[0025] 도 3은 상기 등분된 라만시프트 파장대의 신호값을 기준으로 폐암세포와 암세포를 주성분분석법으로 분류한 결과이다.

[0026] 도 3을 참조하면, 상기 분류 결과 중 붉은색 면은 폐암군, 파란색 면은 정상세포군이다. 즉, 본 발명은 상기 주성분분석법으로 분류하는 단계에서 암 세포 영역과 정상 세포 영역으로 라만 신호를 구분하며, 그 결과를 임의 세포의 라만 신호와 비교하여 상기 임의 세포가 정상세포인지 또는 암세포인지를 구분한다.

[0027] 도 4는 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따른 세포 진단 방법의 단계도이다.

[0028] 도 4를 참조하면, 상기 세포 진단 방법은, 상술한 방법에 따라 엑소좀의 라만 신호를 분류하는 단계; 임의 세포로부터의 라만 신호를 측정하는 단계; 상기 측정된 라만 신호를 상기 분류된 엑소좀의 라만 신호와 비교하는 단계; 및 상기 비교하는 단계의 결과에 따라 상기 임의 세포의 종류가 결정되는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 진단 방법을 제공한다.

[0029] 즉, 본 발명에서 상기 임의 세포의 라만 신호는 제 2항과 동일하게 등분되어 신호값을 얻으며, 이에 따라 미리

분류된 결과와 이를 매칭하여 그 결과가 도 3의 붉은색 면에 있는 경우, 암일 가능성이 높은 세포로 판단하여, 암을 진단한다.

[0031] 1. 엑소좀 분리

[0032] 암 세포 및 정상 세포를 24~48시간 키운 각각의 배지 50ml를 원심분리기에서 $500\times g$ 의 조건으로 원심분리시킨 후, 바닥에 영긴 세포 파편을 제외한 상층액을 분리시켰다. 상기 분리시킨 상층액을 다시 $10,000\times g$ 의 조건으로 원심분리시키고, 세포파편들을 제외한 상층액을 여과시켰다. 상기 여과시킨 상층액을 100,000의 분획분자량(MWCO, molecular weight cut-off)을 가지는 필터(centrifugal filter)를 이용하여 농축시켰다. 상기 농축액을 컬럼크로마토그래피를 이용하여 크기별로 분류하고, 나노입자분석기(DLS, dynamic light scattering) 또는 NTA(nanoparticle tracking analysis)를 이용하여 엑소좀에 해당하는 50~200nm 부분만을 분류하였다.

[0034] 2. 표면 증강 라만 분석법(SERS, Surface enhanced Raman spectroscopy)

[0035] 커버글라스 위에 금 나노 파티클과 10mM의 CuSO_4 를 처리하고, 상온에서 건조시켰다. 상기의 과정으로 제작된 기판 위에 엑소좀을 처리하고 상온에서 건조시켰다. 10mW의 785nm 레이저를 엑소좀 위에 조사하고, 스펙트로미터 앞에 785nm의 필터를 설치하고 획득 시간은 10초로 설정하여, 스펙트로미터에서 찍히는 400~2200nm의 라만 신호를 얻었다.

[0037] 3. 주성분분석법(PCA, Principal component analysis)

[0038] 상기 표면 증강 라만 분석법을 통해 획득된 라만 신호의 baseline을 깎고, 전체 신호의 면적이 1이 되도록 정규화시켰다. 각 세포군별로 얻은 라만 신호를 MATLAB 프로그램을 이용하여 주성분분석(PCA)을 진행하였으며, 이때 주성분(Principal component)는 구분이 잘되는 축을 선택하여 사용하였다.

[0039] 보다 구체적으로, 주성분분석법(PCA)을 수행함에 있어서, 각 폐암세포 유래의 엑소좀, 폐포 유래의 엑소좀, PBS의 라만 신호를 1030개의 wavenumber로 나누어(474.655cm^{-1} , 476.123cm^{-1} , 477.590cm^{-1} , ..., 1799.126cm^{-1}) variable로 설정한 후, 각각의 샘플이 최대 공분산을 이루도록 하는 축인 PC 2개를 채택하여 score plot에 점(각 샘플별 라만 신호)으로 나타낸다. 도 6은 폐암세포(H1299) 유래의 엑소좀, 폐포(alveolar) 유래의 엑소좀, PBS의 라만 신호를 각각 빨간색, 파란색, 검은색의 점으로 나타낸 score plot이다. 상기 도 6의 score plot으로부터 각각의 세포군의 엑소좀이 서로 분리되는 것을 확인할 수 있다.

[0040] 이 때, 상기 엑소좀의 분리 기준은 loading plot을 이용하여 확인할 수 있다. 도 7은 loading plot을 나타내며, 가로축은 PC 1으로, 세로축은 PC 2로 이루어진 점들을 통합한 것을 뜻한다. 암 세포의 라만 신호가 PC 1의 음의 peak 부분(도 7의 파란색 삼각형)에서 intensity가 높고, PC 2의 양의 peak 부분(도 7의 빨간색 삼각형)에서 intensity가 높은 경우, 상기 도 6의 score plot에서 좌측 상단에 점들이 찍히게 된다. 즉, 각 PC의 peak들이 폐암 세포 유래의 엑소좀, 폐포 유래의 엑소좀, PBS의 라만 신호를 분류하는 기준 peak로 작용할 수 있다.

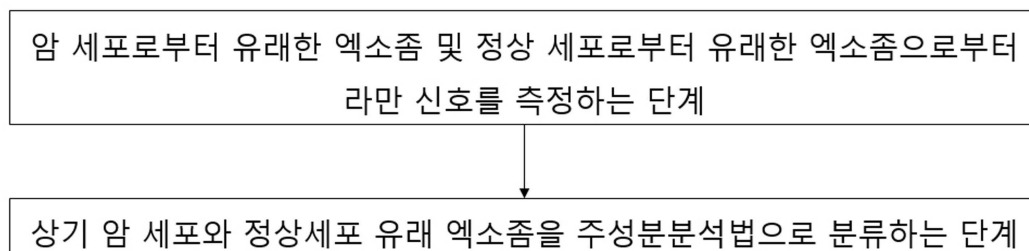
[0043] <실시예 1>

[0044] 표면 증폭 라만 산란(SERS)을 위한 기판을 제작하기 위하여 80nm의 금 나노 파티클 $5\mu\text{l}$ 를 커버 글라스 위에 처리하고, CuSO_4 를 이용하여 응집시킨 후 건조시켰다. 상기 건조된 금 나노 파티클 위에 1×10^9 particle/ml의 엑소좀 $50\mu\text{l}$ 를 처리한 후, 다시 건조시켰다. 상기 건조시킨 커버글라스를 현미경 위에 올린 후, 파장이 785nm인 레이저로 조사하고, 방출되는 산란광을 분광기를 통하여 측정하였다. 이에 따라, 획득되는 $500\sim 2000\text{cm}^{-1}$ 에 해당하는 라만 산란을 추출하였다. 그 결과, 암 세포로부터 유래한 엑소좀 및 정상 세포로부터 유래한 엑소좀으로부터 라만 신호를 측정할 수 있었다. 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 라만 신호 분석방법의 모식도이다.

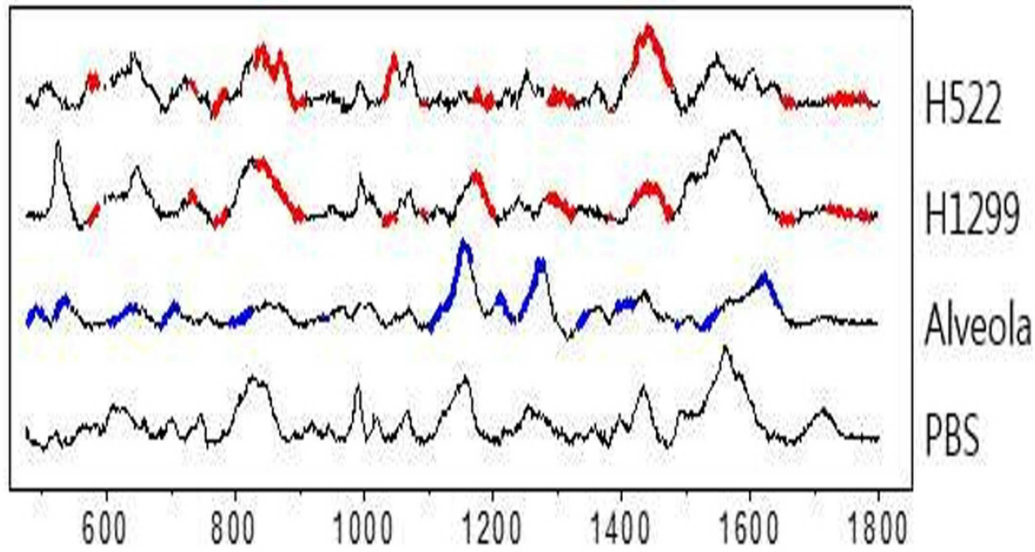
- [0046] 본 발명에서는 상기 암 세포와 정상세포로부터 유래한 엑소좀을 주성분분석법을 통하여 분류하기 위하여, 통제 집단으로 PBS 용액을 이용했고, 암 세포는 H1299(폐암)를 사용 했으며, 정상 세포는 폐포(Alveolar cell)를 사용하였다. 이로부터 유래한 엑소좀의 라만 산란 그래프를 종류별로 측정한 뒤, 주성분분석(PCA)을 수행하였다.
- [0047] 특히, 상기 주성분분석법을 수행하기 위하여 상기 측정된 라만 신호의 파장을 복수 개로 등분하여 각 등분된 파장대에서의 신호값을 변수로 이용하여 진행되도록 하였다. 또한, 주성분분석은 90%의 confidence ellipse를 가지도록 원을 구분하였다.
- [0048] 그 결과, 암 세포 영역과 정상 세포 영역으로 서로의 영역이 각각 구분되어, 암의 조기 진단이 가능한 것을 확인할 수 있었다.
- [0049] H1299(폐암) 및 Alveolar cell(폐포)로부터 유래한 엑소좀의 라만 신호를 획득하고, 상기 획득된 라만 신호로부터 라만픽을 구분하였다. 상기 획득된 라만 신호를 주성분분석(PCA)을 통하여 폐암 세포와 정상 세포로부터 유래한 엑소좀을 구분할 수 있었으며, 그 결과는 상기 도 2 내지 3에 도시된 바와 같다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 실시예로, 폐암에 해당하는 다른 암세포를 이용하거나 섬유아세포 등의 다른 정상세포를 사용할 수 있다. 또한, 혈액암 세포로부터 유래한 엑소좀과 정상 세포로부터 유래한 엑소좀을 구분할 수 있다.
- [0051] 엑소좀의 라만 신호를 분류하여 임의의 세포로부터의 라만 신호를 측정하고, 상기 측정된 라만 신호를 상기 분류된 엑소좀의 라만 신호와 비교하였다. 그 후, 상기 비교 결과에 따라 상기 임의의 세포의 종류를 결정하였다. 상기 기재된 방법에 따라, 세포 진단이 가능한 것을 확인할 수 있다.
- [0052] 특히, 상기 임의의 세포의 라만 신호는 파장을 복수 개로 등분하여 각 등분된 파장대에서의 신호값을 획득할 수 있다.
- [0054] 이상에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 도시하고 설명하였지만, 본 발명은 상술한 특징의 실시예에 한정되지 아니하며, 청구범위에서 청구하는 본 발명의 요지를 벗어남이 없이 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변형 실시가 가능한 것은 물론이고, 이러한 변형 실시들은 본 발명의 기술적 사상이나 전망으로부터 개별적으로 이해되어져서는 안될 것이다.

도면

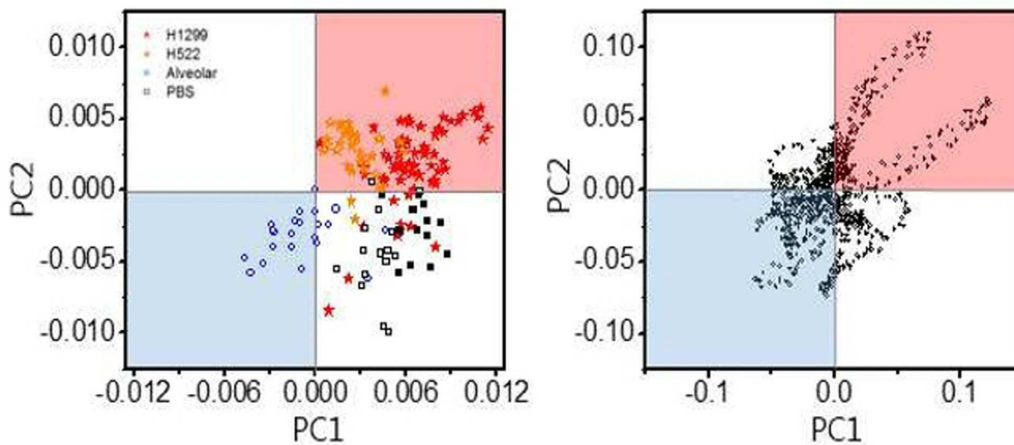
도면1



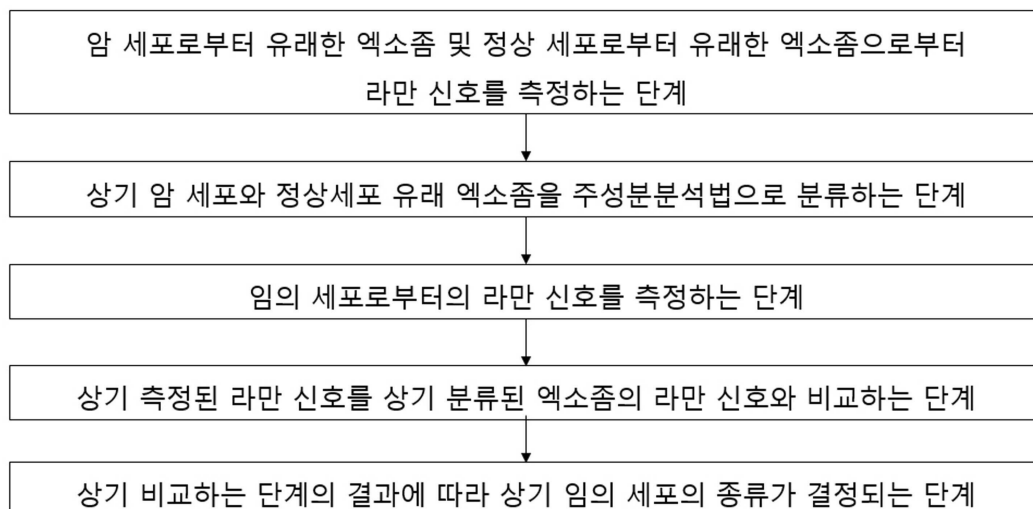
도면2



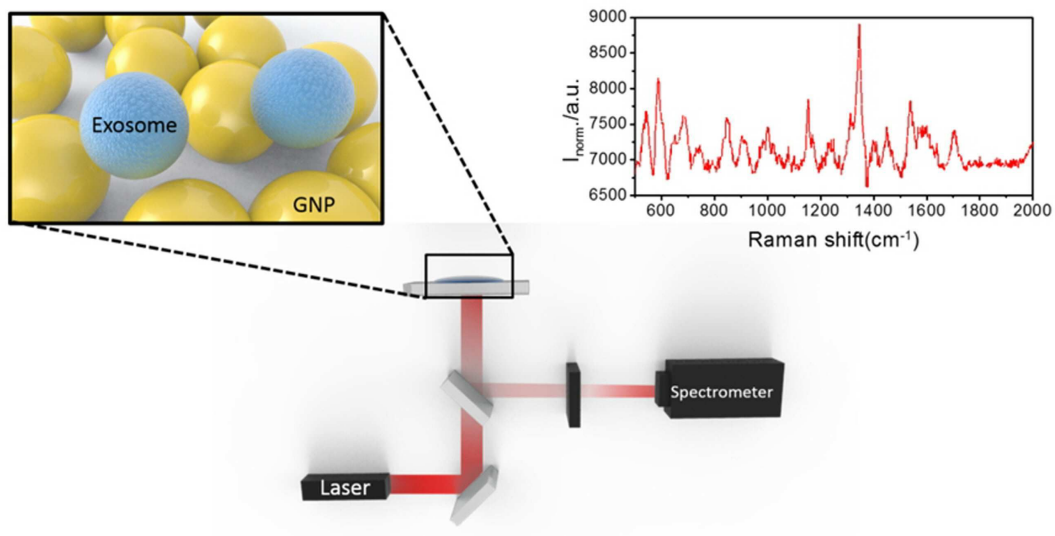
도면3



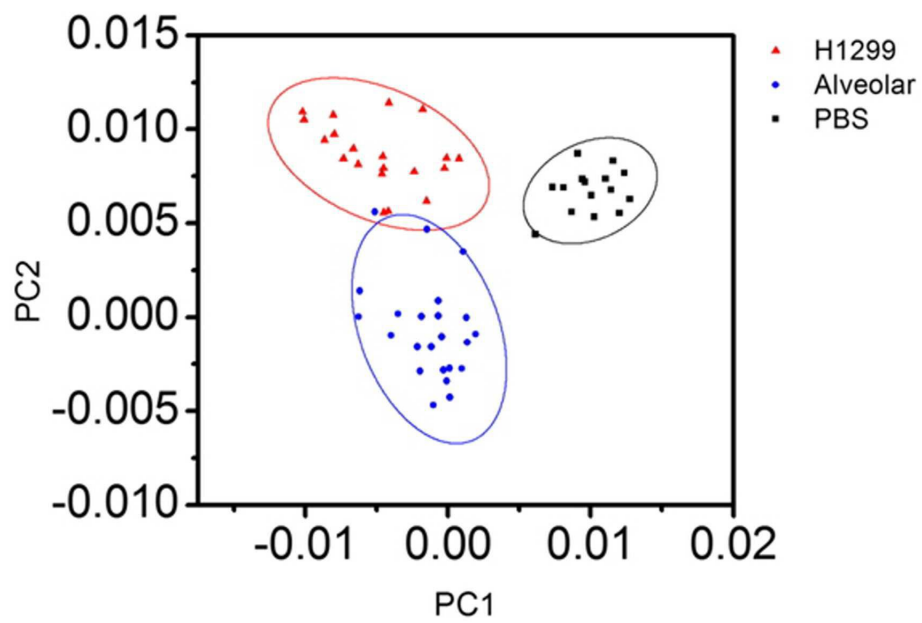
도면4



도면5



도면6



도면7

